2013.03.29 版

ヨーネ病検査マニュアル

（独立行政法人）農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域
（ヨーネ病）

１．　疫学調査

・汚染地域からの牛導入の有無
・輸入牛導入の有無
・過去５年以内のヨーネ病発生、あるいは導入先でのヨーネ病発生の有無

２．　臨床検査

・慢性の頑固な下痢
・泌乳量の低下
・下顎部の冷性浮腫
・削痩

３．　細菌学的検査

(1) 糞便塗抹検査（抗酸菌染色：チール・ネルゼン染色）

糞便の直接塗抹標本を好酸染色し、集塊状の好酸菌を確認する。

染色方法：

1）希釈糞便の塗抹標本作製、火炎固定
2）チール・ネルゼン石炭酸・フクシン染色液添加、加温染色４～５分
（湯気が出る程度に加熱、沸騰しないように注意）
3）水洗
4）塩酸アルコールによる脱色（赤い色が出なくなるまで）
5）水洗
6）メチレンブルー液による染色１分
7）水洗、乾燥

(2) ヨーネ菌分離培養法

Ⅰ．糞便の処理方法

1）糞便１ｇを 20 ｍl の滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合撹拌する。
2）30 分間静置後、上清５ｍl を 20ml の 0.75%ﾍｷｻﾃﾞｼﾙﾋﾟﾘｼﾞﾆｳﾑｸﾛﾗｲﾄﾞ(HPC)と混合する。

> HPC 溶液は 1/2 濃度の Brain Heart Infusion (BHI)培地 (DIFCO, Code:237500 等)で作製する。

3）一夜（16～18 時間）37℃に静置する。
4）900ｇで 30 分間遠心し（低温で遠心すると HPC が析出する為、25℃前後で）、上清を捨て、沈殿物を１ｍl の抗生物質液に再浮遊させ、37℃２日間感作する。

> 抗生物質液：バンコマイシン(vancomycin) 50 μg/ml, ナリジクス酸(nalidixic acid) 50 μg/ml, アンホテリシン B (amphotericin B) 50 μg/ml, 1/2 濃度の BHI 培地で作製する。
> Vancomycin （Sigma V-2002 等）
> Nalidixic acid (sodium salt)（Sigma N-4382 等）
> Amphotericin B（ファンギゾン、ブリストル製薬 KK 等）

［抗生物質液作製法］

アンホテリシンＢは溶けにくく、1/2 濃度ＢＨＩで作製すると、完全に透明にはならず少しずつ濁ってくるため、以下のようにして液を作製する。バンコマイシン、ナリジクス酸を 1/2 濃度ＢＨＩで作製後、濾過滅菌する。アンホテリシンＢ（注射用バイアル入り）は滅菌済み 1/2 濃度ＢＨＩで調製し、無菌的に前者に添加する。あるいは、バンコマイシン、ナリジクス酸は通常濃度の BHI 培地で作製、濾過滅菌し、アンホテリシンＢ（注射用バイアル入り）は滅菌済み蒸留水で調製し、無菌的に前者と等量混合し、各抗生物質の濃度を最終的に合わせる。抗生物質を混合した液は少し濁ってくるがそのまま用いる。また、調製した抗生物質液は小分け後、-20℃に保存する。

（糞便処理法参考文献：Stabel, J. Vet. Diagn. Invest. 9:375-380, 1997）

II. 寒天培地を用いるヨーネ菌の培養検査

1. 培地の準備

(1)マイコバクチン、卵黄液添加 Middlebrook 7H10 寒天培地(7H10MEY 培地)、マイコバクチン添加ハロルド培地等、ヨーネ菌の培養に適した寒天培地を用いる。

(2) 7H10MEY 培地(Middlebrook 7H10 Agar medium with mycobactin and egg yolk）の作製方法

	培地作製量		
	1 L	1.5 L	3 L
1) Middlebrook 7H10 Agar (Difco 262710)	19 g	28.5 g	57 g
2) グリセリン	5 ml	7.5 ml	15 ml
3) 蒸留水	750 ml	1,125 ml	2,250 ml

加温溶解、121℃ 10 分間オートクレーブ後, 55℃程度まで冷却し、下記の成分を加える。

4) Mycobactin（エタノールに溶解,1mg/ml）	2 ml	3 ml	6 ml
5) 2% Malachite green in DW（高圧滅菌）	2.5 ml	3.7 ml	7.5 ml
6) 50% 卵黄液（アテクト製等）	150 ml	225 ml	450 ml
7) Middlebrook OADC Enrichment (BD BBL, Code No.:211886)	100 ml	150ml	300 ml
8) Vancomycin (25 mg/ml)	2 ml	3 ml	6 ml
9) Naladixic acid （塩酸塩）(25 mg/ml)	2 ml	3 ml	6 ml
10) Amphotericin B （ファンギゾン）(10 mg/ml)	5 ml	7.5 ml	15 ml

スターラーで攪拌しながら、培養チューブに分注する（10ml/tube）。

2. 培養方法：

1) 抗生物質処理糞便浮遊液 0.1 ml を複数本のヨーネ菌用寒天培地に接種する。

2) 接種液が培地全体によくゆきわたるよう培地表面を水平に保ち、培養瓶のフタを弛めて37℃孵卵器内に 5～7 日間保ち、培地表面を概ね乾かした後、フタを締め培養瓶を立てて37℃で培養する。

3) 培養は 37℃で３ヶ月以上行う。培養後６週目から毎週１回コロニーの発現を観察する。ヨーネ菌の中には発育が極めて遅い株が存在する為、可能であれば５ヶ月間培養を続ける。

4)培地上のヨーネ菌と疑われるコロニーについて、DNA を抽出し、IS*900* 等のヨーネ菌に特異的な DNA を PCR 等により検出することによりヨーネ菌を同定する。

5) ヨーネ菌コロニーの発現を認めた場合は陽性、認めなかった場合は陰性とする。

6) ヨーネ菌同定用 PCR 検査

i) 準備

1) ヨーネ菌遺伝子増幅試薬（QuantiTect SYBR Green PCR Kit、Cat.No.:204143(キアゲン社)）、あるいは動物用体外診断用医薬品「ヨーネジーン・KS」（共立製薬(株)）

2) プライマー（ゲル濾過精製以上）

MP10-1：5’ ATGCGCCACGACTTGCAGCCT 3’ (mer:21)

MP11-1：5’ GGCACGGCTCTTGTTGTAGTCG 3’ (mer:22)

3）簡易 DNA 抽出剤（BioRad 社、InstaGene®等）
3）滅菌蒸留水
4）リアルタイム PCR 装置

ⅱ）DNA の抽出（InstaGene®を用いる場合）
寒天培地上のコロニーより１エーゼ程度をとり、滅菌蒸留水にて菌浮遊液を作製
↓
10,000 rpm５分遠心、上清を除去
↓
沈査に簡易 DNA 抽出剤を 200μl 添加
↓
ピペッティングによりよく攪拌、Vortex
↓
56℃、15 分間感作
↓
100℃、８分間処理
↓
10,000 rpm５分遠心
↓
上清を PCR に用いる。

ⅲ）PCR

PCR 用の反応液を下記のように調製する（「ヨーネジーン・KS」を用いる場合はキット添付の術式に従って調製する）。

PCR Master Mix*	25 （μl）
Primer 10-１(100 pmol/μl)	0.25
Primer 11-１(100 pmol/μl)	0.25
D.W.	19.5
菌由来 DNA 液	5
Total	50

*QuantiTect SYBR Green PCR Kit(キアゲン社、Cat.No.:204143)

PCR 温度条件

95°C, 15 分（キアゲン社製リアルタイム PCR 試薬を用いる場合）
↓
95°C, 30 秒 ┐
↓↑ 45 cycles
68°C, 1 分 ┘
↓
Melt curve 解析へ

上記の PCR 条件に従ってリアルタイム PCR を行い、融解曲線解析（Melt curve 解析）において、11 ページ表２の各リアルタイム PCR 装置における所定の解離温度を示すピークが認められた場合は陽性とし、ヨーネ菌と同定する。PCR 産物の電気泳動による検査は、検査室のコンタミネーションを起こす可能性が高い為、検査はリアルタイム PCR により実施する。

III.　液体培地を用いるヨーネ菌培養検査

1）液体培地調製法

液体培地：BD BACTEC MGIT ParaTB Medium（ベクトンディッキンソン社、Code, 245154、現在国内の市販カタログには記載されていないが購入可能）

菌増殖の指標：MGIT ParaTB Medium には培養チューブ底面に酸素濃度に反応する蛍光センサ-が装着されている。培養チューブ内で菌が増殖し、培地中の酸素が消費され溶存酸素濃度が低下すると、蛍光センサ-の蛍光強度が上昇し、チューブ内で菌が増殖したことが間接的に把握できる。蛍光強度の上昇は、何らかの微生物が培養チューブ内で増殖（酸素を消費）したことを示すのみで、増殖した菌がヨーネ菌か否かの同定試験が必須である。

上記液体培地以外に以下の培地補助添加剤（ParaTB supplement)、50%卵黄液、糞便処理に用いた抗生物質類、及び滅菌蒸留水が必要。

- BD BACTEC MGIT Para TB Supplement®（培地添加剤；Code, 245156）
- 50%卵黄液（株アテクト製等）
- Vancomycin、Nalidixic acid （sodium salt）、Amphotericin B
- 滅菌蒸留水

培地作製法：液体培地に添付された取扱説明書にある通り、以下のように作製した培地添加剤を培養チューブ1本あたり **1.5 ml** 添加する。

添加成分	培地添加剤の必要量			
	10 ml	15 ml	30 ml	60 ml
ParaTB Supplement	5.3 ml	8 ml	16 ml	32 ml
2.5% Vancomycin*	40 μl	60 μl	120 μl	240 μl
2.5% Nalidixic acid*	40 μl	60 μl	120 μl	240 μl
1% Amphotericin B**	38 μl	57 μl	114 μl	228 μl
50% 卵黄液	3.3 ml	5 ml	10 ml	20 ml
滅菌蒸留水	1.3 ml	2 ml	4 ml	8 ml
*:25 mg/mlの濃度に蒸留水で作製後濾過滅菌する。-20℃保存				
**:10 mg/mlの濃度に注射用薬を滅菌蒸留水で溶解する。-20℃保存				

2）抗生物質処理糞便浮遊液 0.1 ml を液体培地（BD BACTEC MGIT ParaTB Medium®）に接種する。接種後培養チューブをよく転倒混和し 37℃で培養する。

3）液体培地は、培養チューブ底部の蛍光インディケーターを毎週観察する。（蛍光を観察する為に、長波長（365 nm）のＵＶランプ、400～450nm の UV LED ランプ等を準備する）。 蛍光を観察する時に UV ランプを培地底面に近付けすぎると、蛍光を発している培養チューブと発していないチューブとの差が分かりにくい為、ランプは培養チューブ底面から少し離して（10～20ｃｍ程度）照射する。

4）何も接種しない液体培地のコントロールを 2 本以上作製し、同時に培養を開始する。もし、コントロール培養チューブで非特異的な蛍光の上昇を認めた場合は、全ての培養チューブを一度転倒混和し、24 時間後に再度蛍光の有無を観察する。菌の増殖によって蛍光を発している場合は、24 時間後に再度蛍光が認められるが、非特異的な発色の場合は、転倒混和後には蛍光は観察されない。液体培地は 2 ヶ月間培養を続け、最終的な菌増殖の有無を判定する。

5）蛍光を発した液体培地から培地を少量（170μl、液体培地量の約 1/50 量）取り、DNA を抽出してリアルタイム PCR により IS*900* を検査、定量する。

液体培地からの DNA の抽出法：

ⅰ）培養上清を 100℃8 分間加熱し、その遠心上清（13,000 rpm, 5 分）を PCR 検査に用いる。また、ヨーネ菌 DNA 濃度を正確に定量する場合は、市販のヨーネ菌 DNA 抽出・精製キットを用いる。なお、BioRad 社の InstaGene®は液体培地からの DNA 抽出には使用できない。

ⅱ）リアルタイム PCR 検査は、2 ページの 6）ヨーネ菌同定用 PCR 検査に従って実施する。

（3）ヨーネ病遺伝子検査（糞便中のヨーネ菌 DNA の検出）

６ページ以降のヨーネ病遺伝子検査に詳細な検査方法を記載。

４． 免疫学的検査

(1)エライザ検査

血清中のヨーネ菌に対する抗体を検出する。

市販の牛ヨーネ病診断用エライザキットを使用する。使用方法は製品添付の説明書に従う。

(2)補体結合反応

血清中のヨーネ菌に対する抗体を検出する。

補体結合反応用抗原を使用して検査する。使用方法は製品添付の説明書に従う。

(3)ヨーニン検査

皮内反応によりヨーネ菌感染個体の細胞性免疫反応を検出する。

ヨーニン皮内反応用抗原を使用して検査する。使用方法は製品添付の説明書に従う。

５． 病理学的検査

(1)剖検

空腸、回腸、回盲部粘膜の肥厚、顕著な雛壁の形成

腸間膜リンパ節の髄様腫脹

(2)病理組織学的検査

粘膜固有層、粘膜下識及び腸リンパ節における類上皮細胞のび慢性増殖とラングハンス巨細胞の出現

1）検査用材料の採取、固定

・採取部位

1. 回腸末端部　回盲部より 10cm 位上
2. 回盲部から 30cm 上
3. 回盲部から 50cm 上
4. 回盲部から 1m 上
5. 空腸（パイエル板が明瞭に見える部位）
6. 回盲リンパ節
7. 回腸部腸間膜リンパ節
8. 空腸部腸間膜リンパ節
9. 雌の場合には乳房上リンパ節

・腸管の採取、固定方法：病理検査用の腸管は約 10cm の長さで、管状に切り取り、管状のまま開かないで、切り取ったあと、一端をピンセットでつまんだまま腸を静かにホルマリン容器に入れ、ピンセットで固定している開口部から 50ml のディスポ注射筒で 10-20%中性緩衝ホルマリンを注ぎ込み、掴んだピンセットで腸組織を固定液に静かに沈め少し揺する。さらに２回ホルマリンを流し込み、静かに固定ビンに沈める。

2）パラフィンブロック作製、染色、鏡検

組織の切り出し(腸管固定標本からは２～３カ所切り出すことが望ましい)、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色、必要に応じてチール・ネルゼン染色を行い鏡検する。

ヨーネ病遺伝子検査法（糞便中ヨーネ菌 DNA の検出）

ヨーネ菌には種々の特異的遺伝子や挿入配列（IS）が存在し、それらを利用した Polymerase Chain Reaction（PCR）によるヨーネ菌遺伝子検出系が既に多く報告されている。それらの中でヨーネ菌 IS*900* をターゲットとする PCR は、本 IS がヨーネ菌に 15～20 コピー存在する為（Green, 1989）、高い感度が得られる検出系として有用である。一方、IS*900* の DNA 塩基配列にヨーネ菌株間の差は殆どないが、スウェーデンで分離されたヨーネ菌以外の抗酸菌である *Mycobacterium* sp. 2333 株は、IS*900* と高い相同性（94%）有する IS を保有することが報告されている（Englund, 2002）。そこで、*Mycobacterium* sp. 2333 株を含めヨーネ菌と類似した抗酸菌とは交差しないように PCR 用のプライマーを設計し、種々のリアルタイム PCR 用反応液を比較検討することにより、感度と特異性ともに優れた検査法が確立された。

１.測定の原理（蛍光色素を用いたインターカレーション法）

ヨーネ菌のみが持つ IS*900* 中の特定塩基配列を、PCR により試験管内で増幅する。この時、二本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光色素である SYBR Green I を反応系に添加しておくことにより、反応の進行に伴って増幅された二本鎖 DNA に SYBR Green I が取り込まれ（インターカレーション）、DNA への結合により蛍光強度が増加する（図 1）。PCR の伸展反応過程で反応液の蛍光強度を測定することにより、PCR 産物の増加をリアルタイムで検出することが可能となる。

インターカレーション法によるリアルタイム PCR では、非特異的な DNA が増幅された場合にも蛍光強度が増す為、特異的反応と非特異反応を区別する為に解離温度解析（メルトカーブ解析、あるいはディソシエーション解析）を行う。２本鎖 DNA はその塩基配列により Tm 値（２本鎖 DNA の半分が１本鎖に解離する温度）が決まる為、PCR 後に反応液の温度を少しずつ上昇させ、２本鎖が１本鎖に分かれる温度、つまり DNA に取り込まれていた蛍光色素が外れて、蛍光強度が急激に低下する温度を分析する。図２に示した例では、増幅された IS*900* の PCR 産物は 88℃付近から１本鎖に分かれはじめるが、非特異的増幅産物は 80℃付近から蛍光強度が下がり始めるので、両者を簡単に区別することが可能である。さらに、リアルタイム PCR 検査では PCR によりターゲット遺伝子の増幅が指数関数的に起こる領域内に閾値を設定し、蛍光増幅曲線が閾値と交差する点を Threshold cycle（Ct）値とし（図３-A）、Ｃｔ値から各サンプル中のターゲット遺伝子の初期濃度を算出することが可能である。初期 DNA 濃度算出用の検量線を作製するために，異なる濃度の参照 DNA の Ct 値に対してそれぞれの DNA の含有量（対数値）をプロットし（図３-B），検量線の一次関数式を求める。本式を用いて，未知サンプルの Ct 値よりサンプル中のターゲット遺伝子量を算出することが出来る（図３-B）。

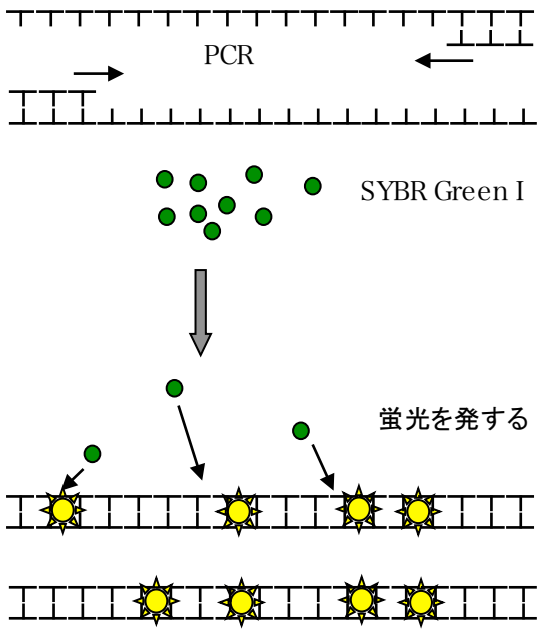


図１.SYBR Green I **インターカレーター法**

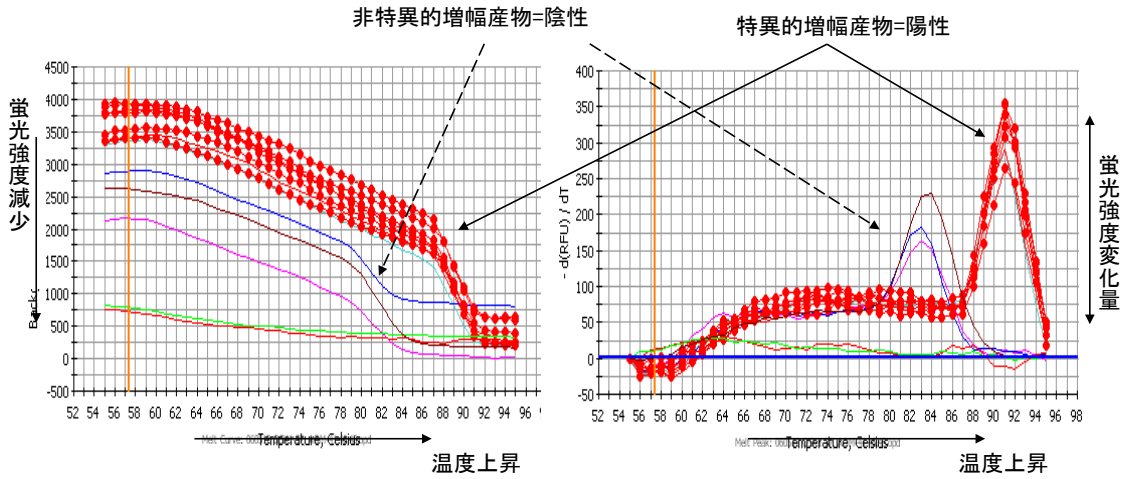


図２. 融解曲線解析による特異性の検討
左図：温度上昇により解離温度に達すると蛍光強度が低下する。
右図：上記のデータを一次微分した結果

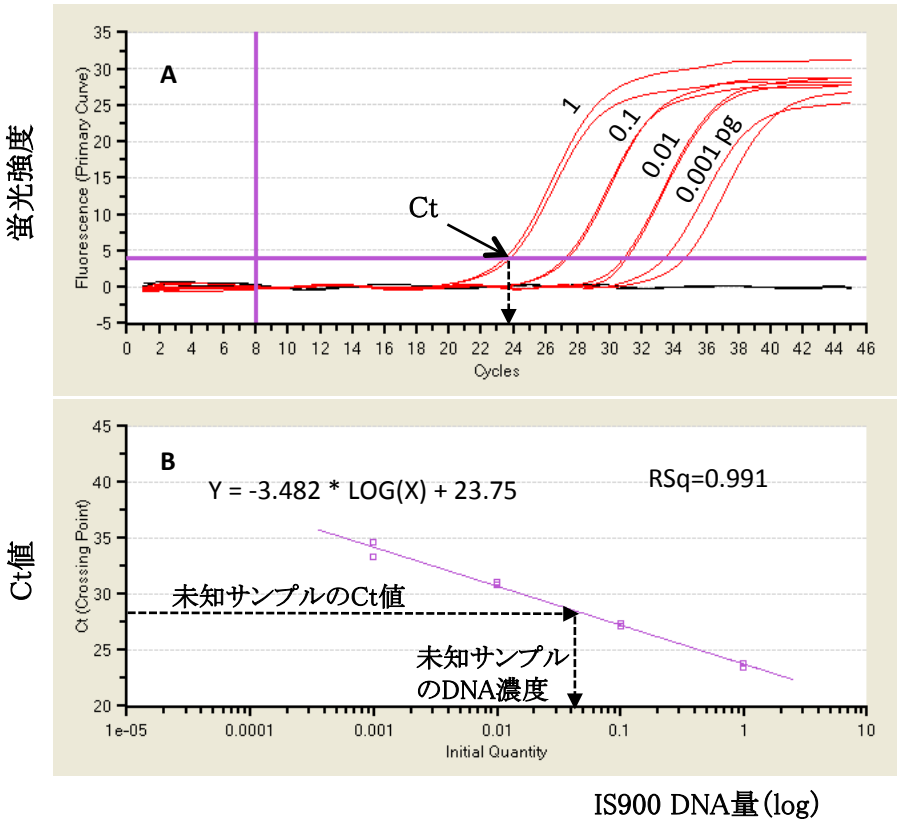


図3. スレッショルド・サイクル値（Ct値）および検量線による糞便中ヨーネ菌IS900DNA量の算出法
A: 指示陽性DNAを10倍階段希釈し，各well当たり1～0.001 pgのDNAを添加した時の蛍光増幅曲線
B: 各濃度の指示陽性DNAサンプルにおけるCt値より求められた検量線（Y=−3.482*Log (X)+23.75）より被検サンプル中のヨーネ菌DNA濃度を計算する。

２． 試薬・器具の準備

診断薬、試薬類：

1) 動物用体外診断用医薬品「ヨーネジーン・KS」（ヨーネ病遺伝子検査薬、共立製薬(株)）
2) ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネスピン®」（(株)ファスマック）
3) 牛糞便用ヨーネ菌核酸調製試薬、「ヨーネプレップ®」（共立製薬(株)）
4) クロロホルム
5) イソブタノール
6) イソプロパノール
7) エタノール
8) 滅菌生理食塩水、TE 緩衝液（Tris-HCl(pH8.0) 10 mM, EDTA 1 mM）

器具機材類：

1) リアルタイム PCR 装置
以下の各社のリアルタイム PCR 装置が使用可能である。

表１．リアルタイム PCR 装置

メーカー名	機種名
アジレントテクノロジー	Mx3000p
アプライドバイオシステムズ	ABI7300
	ABI7500
	ABI7500Fast
	ABI7900HT
	StepOnePlus
タカラバイオ	Dice TP800
バイオ・ラッドラボラトリーズ	iCycler
	Chromo4
	CFX96
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 480
	LightCycler 96
	LightCycler Nano

2) 2 mL のチューブ：（破砕、抽出用、アシスト社 Code:72.693.100 等）
3) ビーズ式破砕装置
以下の各社の装置が使用可能である。
・ミニビードビーター（和研薬株式会社）
・マルチビーズショッカー（安井機器株式会社）
・シェイクマスター（株バイオメディカルサイエンス）
・シェイクマスターネオ（株バイオメディカルサイエンス）
・マイクロスマッシュ（トミー精工）
・ファーストプレップ（フナコシ）
・プリセリーズ 24（エムエス機器株式会社）
・その他、ビーズ式破砕機能を有する機器
4) 1.5 ml マイクロチューブ
5) ピペット、マイクロピペット、チップ等
6) PCR 用 96-well プレート及びキャップ（あるいはシール）

３． 検査方法

(1)糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出

以下の何れかの製品を用いて、糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出・精製を行う。

・牛糞便用ヨーネ菌核酸調製試薬、「ヨーネプレップ®」（共立製薬(株)）

・ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネスピン®」（(株)ファスマック）

１）ヨーネプレップ®を用いる糞便からの DNA 抽出

1. ループスクリューキャップ（2 mL）にジルコニアビーズ（微粒子）を付属の計量チューブを用いて、容積で 0.3mL、若しくは重量で 1.5 g を分注する。
2. 糞便１ g を 20ml の滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合撹拌する（30 分間）。30 分間静置後、上清 1 mL を微粒子入りのチューブに移す。
3. このチューブを遠心（10,000 rpm で 5 分）し、マイクロピペットを用いて微粒子より上の上清を除去する(マイクロピペットで上清を除去するとき､微粒子を吸い込まないように注意、多少液が残っていても良い）。
4. このチューブに糞便洗浄試薬 1mL 加え、ミキサーを用いて再懸濁する。さらに、チューブを遠心(10,000rpmで 5 分)し､マイクロピペットを用いて微粒子より上の上清を除去する(マイクロピペットで上清を除去するとき、微粒子を吸い込まないように注意、多少液が残っていても良い）。
5. このチューブに核酸抽出試薬 700μＬと有機溶媒（クロロホルム：イソブタノール＝１：１の混合液、要時調製）700μＬを加える。
6. 抽出試薬及び有機溶媒を加えたチューブをビーズ式細胞破砕機を用いて激しく攪拌後（破砕条件は下記の付記 1.参照）、遠心（10,000rpm で 5 分）する。
7. 遠心分離後、上清 350μＬを、新しい 1.5mL マイクロチューブに移し、さらにイソプロパノール 350μＬを加える。チューブを転倒混和した後、遠心（15,000rpm で 10 分）する。
8. 遠心分離後、上清をマイクロピペットで除去する。
9. 沈査の残ったチューブに 70%エタノールを 1ｍＬ加え、チューブの底を指ではじき、チューブ壁面から核酸ペレットを剥がすようにしてリンスする。
10. マイクロチューブを遠心（15,000rpm で 3 分）し、上清をマイクロピペットで除去する。チューブを再度遠心（15,000rpm、30 秒～１分）し、管底に溜まった 70%エタノールを、細いチップ等を用いて出来る限り完全に取り除く（この時 DNA のペレットには触れないように注意）。風乾せずに次のステップへ進む。
11. 核酸ペレットに、マイクロピペットを用いて TE 緩衝液あるいは D.W. 50μＬを加え、溶解する。DNA 液は検査を行うまで、氷上に保存する。調製当日に検査を行わない場合は、-20℃に凍結保存する。

2) ヨーネスピン®を用いる糞便からの DNA 抽出

1. 牛糞便 1 g を 20 ml の滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合攪拌（30 分間）した後、30 分間静置し、上清を採取する（牛糞便懸濁液上清）。
2. 2.0 ml チューブ（ビーズチューブ）に 1.の牛糞便懸濁液上清 1.0 ml を移し、遠心（20K×g, 5 分間, 室温）した後、上清を除去する。
3. 600 μl の 抽出液Ⅰ 及び 6 μl の酵素液を添加する。
4. ビーズ式破砕機に 3.のチューブをセットし､良く破砕する(破砕条件は下記の付記 1.参照)。
5. ビーズチューブ内に発生した気泡が少なくなるまで室温で５分間静置する。あるいは、５分間静置せず、遠心（13K×g, 60 秒間, 室温）により気泡を落としても良い。
6. 75 μl の 抽出液Ⅱ を添加し、10 ～ 12 回チューブを転倒し、よく混和する。
7. 遠心（20K×g, 10 分間, 室温）する。
8. 上清 500 μl を新しい 1.5 ml チューブに移す。
9. 400 μl の 吸着液Ⅲ を添加し、10～12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
10. 9.の混合液 900 μl を スピンカラム に移し、遠心（13K×g, 30 秒間, 室温）し、濾液は廃棄する。
11. 600 μl の 洗浄液Ⅳ を 10.で使用したスピンカラム に添加した後、遠心（13K×g, 60 秒間, 室温）する。
12. スピンカラム を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
13. 50 μl の 溶出液Ⅴ をスピンカラムに滴下した後、3 分間室温で静置する。
14. 遠心（13K×g, 60 秒間, 室温）し、濾液を回収する。

（付記 1.）ビーズ式破砕装置及び処理時間：

・ミニビードビーター	4,600 rpm、３分
・マルチビーズショッカー	4,000 rpm、５分
・シェイクマスター	1,500 rpm 30 分
・シェイクマスターネオ	1,500 rpm 15 分
・マイクロスマッシュ	4,600 rpm、３分
・ファーストプレップ	6 m/sec、 90 秒（45 秒 x 2）
・プリセリーズ 24	5,000 rpm、90 秒 x 2 回

(2) リアルタイム PCR 検査

1) 反応液の調製

① 1 サンプルあたり以下のように反応液を調製する。

核酸増幅試薬	25.00μL
プライマー10.1	0.25μL
プライマー11.1	0.25μL
ウラシル - N - グリコシラーゼ（1 unit/μL）	0.50μL
リボヌクレアーゼフリー水	19.00μL
合計	45.00μL

② 指示陽性 DNA を TE 緩衝液を用いて，指示陽性 DNA10μL に対し TE 緩衝液 90μL の割合で混合し，1pg/2.5μL～0.001pg/2.5μL まで 10 倍階段希釈する。このとき，TE 緩衝液 90μL の分注には，容量 100μL～200μL のピペットチップを用い，指示陽性 DNA の分注には容量 10μL のピペットチップを用いる。ピペッティング容量を 50～90μL として，泡立てないようにピペッティングを 10 回行い，よく撹拌する。次いで，マイクロピペットチップを交換し，10 倍階段希釈を行う。作製した各希釈列の指示陽性 DNA は氷上で保管する。

③ 反応液 45μL に糞便抽出 DNA 液を 5μL 添加し，マイクロピペットで良く攪拌する。PCR 用 96 穴プレートを用いる場合は 1 穴あたり 25μL ずつ 2 穴に，0.2mLPCR 用チューブを用いる場合は 1 本あたり 25μL ずつ 2 本に分注する。

④ 各希釈指示陽性 DNA 液 5μL を反応液 45μL に添加し,よく攪拌後，25μL ずつ分注する。陰性対照として DNA 液の代わりに,TE 緩衝液を 5μL 添加した反応液を 25μL ずつ分注する。

⑤ キャップ，あるいはシールを用いて密封した後，ヨーネ菌遺伝子の増幅を行う。

2）反応条件

リアルタイム PCR 装置を用いて，PCR 条件を以下のように設定する。UNG 処理のために 50℃ 2 分間加熱,続いて 95℃15 分間の DNA ポリメラーゼの熱変性後,95℃30 秒間の解離反応，68℃で 1 分間のアニーリング及び伸長反応を 1 セットとし 45 回繰り返す。その後，60℃～98℃の範囲で PCR 産物の融解曲線解析(Melt curve 解析，Dissociation curve 解析)を行う。

50℃　2 分
↓
95℃　15 分
↓
95℃　30 秒　┐
↓↑　　　　　├　45 サイクル
68℃　1 分　┘
↓
60℃
↓　融解曲線解析
98℃

3）試験成立条件

リアルタイム PCR 終了後の解析は基本的には使用機種の自動設定で行う。

試験成立条件：

① 指示陽性 DNA の原液（濃度 1pg/2.5μL）におけるスレッショルド・サイクル（Cycle of threshold; Ct)値が 24±3 サイクルであり,指示陽性 DNA の 1,000 倍希釈液(濃度 0.001pg/2.5μL）において，2 穴中 1 穴以上陽性となる。

② ヨーネ菌 DNA 濃度と Ct 値との用量-反応式の相関係数（R）の二乗値（R^2）は 0.9 以上であり，PCR 効率(Efficiency)は 80～120％である。

*PCR 効率(Efficiency)：リアルタイム PCR の効率は下記の計算式により算出する。

PCR 効率(％) = $(10^{[-1/slope]} - 1) \times 100$

Slope:検量線の傾き（X 軸を初期 DNA 濃度（log10），Y 軸を Ct 値とした場合）

③ 指示陽性 DNA の融解曲線解析（一次微分）におけるピークは，各リアルタイム PCR 装置毎の所定の解離温度の範囲内に認める。（解離温度：融解曲線解析におけるピークは温度上昇に伴う蛍光強度の減少を一次微分し，プラスマイナスを反転させたグラフであり，そのピーク位置を解離温度とする。）

表２．各リアルタイム PCR 装置における解離温度

メーカー名	機種名	解離温度
アジレントテクノロジー	Mx3000p	88℃±1.5℃
アプライドバイオシステムズ	ABI7300 ABI7500 ABI7500Fast ABI7900HT StepOnePlus	87℃±1.5℃
タカラバイオ	Dice TP800	87℃±1.5℃
バイオ・ラッドラボラトリーズ	iCycler	91℃±1.5℃
	Chromo4	87℃±1.5℃
	CFX96	86.5℃±1.5℃
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 480 LightCycler 96 LightCycler Nano	88℃±1.5℃

④ 陰性対照は，蛍光強度の上昇を認めない。もしくは認めた場合，融解曲線解析において指示陽性 DNA と同じ解離温度で蛍光値のピークを認めてはならない。（蛍光強度の上昇：横軸にサイクル数，縦軸に蛍光強度をプロットしたグラフにおいては，蛍光増幅曲線の立ち上がりとして表示される。）

4) 判定

試験成立条件を全て満たし，かつ反応液の蛍光強度が上昇し，1 穴以上で融解曲線解析においてヨーネ菌指示陽性 DNA と同様な解離温度を示した検体をヨーネ菌 DNA 陽性，蛍光強度が上昇しなかった，あるいはヨーネ菌指示陽性 DNA と異なる解離温度を示した検体は DNA 陰性とする。陽性となった検体については，指示陽性 DNA を用いた用量－反応式から検体中のヨーネ菌 DNA 濃度が計算される。なお，DNA 濃度 0.001pg/2.5μL 以上のとき，ヨーネ菌分離成績と高い一致率を示す。ヨーネ病感染の有無の判定は、家畜伝染病予防法施行規則の別表 1 の判定基準（指示陽性 DNA 液を用いた用量反応式からヨーネ菌ＤＮＡ濃度を計算し、検体 0.0025cc 中の DNA 量が 0.001pg 以上と判定された検体を陽性､それ以外の検体を陰性とする。）に従って行う。

4.ヨーネ病検査の精度管理（糞便からの DNA 抽出法の精度管理）

リアルタイム PCR 検査を実施する場合は、DNA 抽出検定用糞便（動物衛生研究所から供給）を用い、ヨーネ菌 DNA 抽出効率の検定を行う。ヨーネ菌遺伝子抽出キットを用いた検定用糞便からの遺伝子抽出効率が許容範囲内であることを確認する。その後、野外サンプルを用いて検査を実施する。

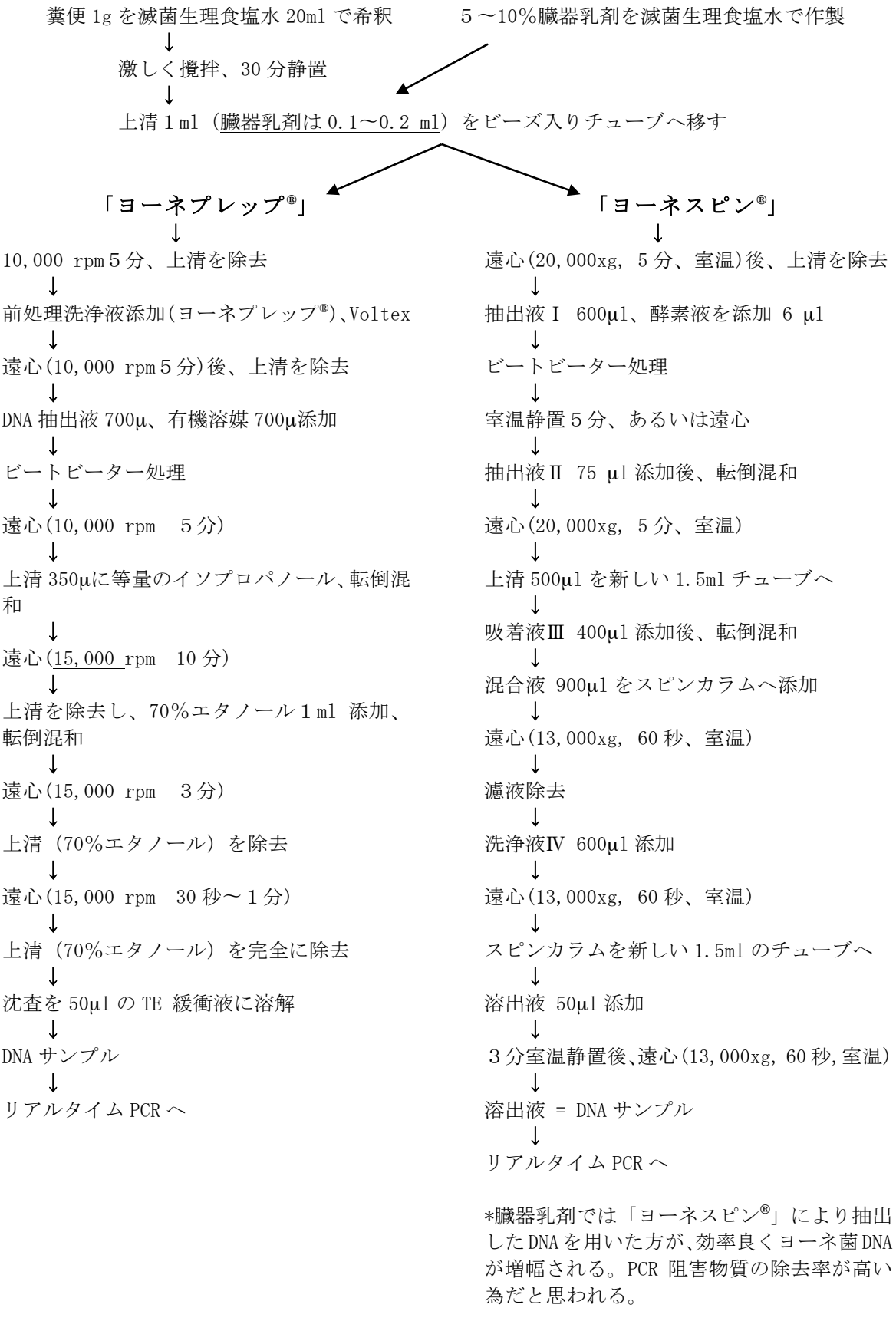
5． PCR 実施上の注意点（コンタミネーションによる偽陽性の防止）

1) テンプレート DNA を含まない陰性対照サンプルを必ず同時に置き、PCR が陰性となることを確認する。
2) PCR 反応液を調製する場所、DNA を抽出する場所、及び PCR を行う場所を別にする。
3) PCR 前のサンプルを扱うマイクロピペット及びチップと、PCR 後のサンプルを扱うマイクロピペット及びチップを別にする。
4) チップはフィルター付きのものを用いる。
5) 取り扱いは常に手袋をして行い、手袋が汚染された可能性が少しでもあれば、手袋を取り替える。
6) 抽出 DNA 液等のチューブの蓋を開けるときは短時間の遠心を行う。

6.ヨーネ病検査方法に関する問い合わせ先

動物衛生研究所細菌寄生虫研究領域
森　康行
TEL & FAX:029-838-7857
Mail:yamori@affrc.go.jp

糞便・臓器乳剤からの DNA 抽出法（フローチャート）



*臓器乳剤では「ヨーネスピン®」により抽出した DNA を用いた方が、効率良くヨーネ菌 DNA が増幅される。PCR 阻害物質の除去率が高い為だと思われる。

病理切片からの抗酸菌 DNA 抽出

1. Takara DEXPAT®(タカラバイオ、Code:TKR-9091)による DNA 抽出

1）組織切片（5～10μm）１～５枚、1.5 ml チューブへ
↓
2）DEXPAT 0.5 ml 添加
↓
3）100℃加熱 10 分
↓
4）12,000 rpm 10 分 遠心
↓
5）DNA 溶液を回収

＊詳細は製品添付のプロトコールに従う。

2. ヨーネプレップによる DNA 抽出

薄切した（5～10μm）組織切片　１～５枚
↓
キシレン 1ml 添加、Voltex、37℃５分
↓↑
12,000rpm５分、上清除去
} x２回
↓
100％エタノール１ml 添加、Voltex
↓↑
12,000rpm５分、上清を除去
} x２回
↓
ビーズを添加、DNA 抽出液、有機溶媒添加（ヨーネプレップ、共立製薬(株)）
↓
ビートビーター処理、4600rpm、３分
↓
10,000rpm　５分
↓
上清+等量のイソプロパノール、転倒混和
↓
15,000rpm　10 分　遠心
↓
上清を除去し、70％エタノール１ml 添加、転倒混和
↓
15,000rpm　３分　遠心
↓
上清を完全に除去
↓
50ml の TE buffer、あるいは DW に溶解する。

参考文献：

1) Plante Y, Remenda BW, Chelack BJ, Haines DM.(1996). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. Can J Vet Res. 1996 Apr;60(2):115-20.

2) Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Denef JF, Cocito C, Gala JL. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium subsp. paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. J Clin Microbiol. 2000 Aug;38(8):3048-54.